

緑膿菌のピオシン型別に関する研究

Ⅳ. 型別法2種を併用しての培地の検討および 集落型の差によるピオシン産生性と感受性

内 藤 達 郎

長崎大学熱帯医学研究所臨床部門

(主任: 内藤 達郎 教授)

小 浦 正 昭・岩 永 祥 子

長崎大学医学部細菌学教室

(主任: 宮本 勉 教授)

(Received for publication May 25, 1972)

Studies on Pyocine Typing of *Pseudomonas aeruginosa*

IV. Comparison of media, pyocine production and sensitivity to pyocine by different colonial types under parallel use of two typing methods

Tatsuro NAITO

*Department of Clinical Medicine, Institute for Tropical Medicine,
Nagasaki University*

(Director : Prof. T. Naito)

Masaaki KOURA and Yoshiko IWANAGA

Department of Bacteriology, Nagasaki University School of Medicine

(Director : Prof. T. Miyamoto)

Abstract

Both the methods of Darrell-Wahba and Gillies-Govan were used in parallel for pyocine typing of test-strains in the present study, consisting of 8 indicators (G1-G8) and 2 type strains (Ty.1 and Ty.16) for the G-G method and of 12 indicators (W1-W12) for the D-W method. In the G-G method defibrinated horse blood was used throughout the present study.

The first experiment was carried out to compare those activities of pyocines produced, with one another, on slightly modified media as described in the remarks for Tables 2 and 4, using the similar slant culture originated from a la colony of each

test-strain. No different patterns were observed on strains shown in Tables 1 and 3. In tables 2 and 4, the first pairs of inhibition patterns for each strain were obtained by the first typing of the experiment, the second pairs were observed by the typing on 2 days later, and the third ones were showed by the typing performed 5 days after the second typing. From these results, it can be said that trypto-soy agar(Eiken)was usefull in place of tryptone soya agar (Oxoid) for both the typing methods and horse blood stored in the refrigerator for 3 weeks had no trouble with the use for the G-G method. It may be worth to pay regard, however, to the result showing that there were some strains producing different pyocines after the storage for one week. Basing upon the reasons obtained from the experiment and after due consideration of the results, trypto-soy agar was used in the further experiments.

Secondly, 6 slants among the test-strains were subjected preliminarily to the comparison of pyocine productivities with one another on the media different from the original method 2 days after the third typing of the first experiment. Excepting G1 from Table 5 and Ty.16 from Table 6, the same pattern in each strain was observed on a different medium each, but many more strains should be to be examined before the definite conclusion can be safely drawn.

The pyocine produced by la and sm colonies and ordinary subcultures of 11 test-strains were studied and typed using 3 sets of indicator under the same cultural condition as the producers on the day. Inhibition patterns observed by different colonial conditions of the producers (Tables 7-10) and sensitivities to the pyocines of the 3 sets of indicator (Tables 11-14) were fairly complicated. Differences of the inhibition patterns between la and sm types of producers were observed in 9 cases by the G-G method (Table 8) and 14 cases by the G-W method (Table 10), and different sensitivities between la and sm sets of indicator were seen in 13 cases by former method (Table 12) and in 19 cases by later method (Table 14). These findings indicate that the colonial type of indicators may be regard as more weighty factor to obtain reproducible results than that of the producers. At any rate, fresh la colonies should be selected and used for the pyocine typing, irrespective of being test-strains to be typed and or of being indicator strains.

In the fourth experiment, a la colony of each indicator and 9 la colonies of type strains were typed using 2 sets of indicator originated from different la colonies selected just before the use. According to the G-G method (Table 15), 33 out of 38 colonies showed no difference between the patterns obtained by 2 sets of indicator, whereas by the D-W mehtod (Table 16), different patterns were observed among 12 out of 29 colonies excepting the results of Ty. 16. From the observation above, it can safely be said that no difference in sensitivity to pyocine and production of pyocine were observed among different la colonies.

緒

言

固型培地平板上での交叉塗抹法によるピオシン型別法には, Darrell and Wahba(1964) と Gillies and Govan (1966) の2法が報告されており, 後者については1, 2報 (1971), 前者は3報 (1972)とそれぞれ個別に基礎的検討を加えてきた。またこれらの研究にやや遅れてあるいは併行して実施されたものとして, 同門の古川 (1970), 村上 (1970) の報告がある。

これらの成績を総合した結果, 残された検討事項の一つとして, 3報考察の終りにのべたように, 両法の比較を行なってそのいずれかを実用化するためには, 古川の第4実験でのみ行なわれたような両型別法の併行実施が既報につぐものとして取上げられるに至った。昭和45年1月以降, 前報供試の分離菌について後法にはその後購入が容易となったウマ血液加培地を使用し

て、前法と同時実施のもとで型別を開始した。さらにその間に両法で基礎培地として用いられている Tryptone soya agar (Oxoid) も入手できたので、基礎培地の差による成績への影響、市販血液とその保存の問題、さらには既報では未実施であった塩野谷、本間 (1968) の sm 型菌をも加えての解離集落型による

産生ピオシンの作用域およびそれらのピオシン感受性などについての検討も行なった。

本報には上記のうち基礎的検討のみを取上げ、分離株に関する型別結果は、その後再び実施した成績をも加えて次報とする予定である。なお本論文の内容は第 43 回日本細菌学会総会シンポジウムにおいて発表した。

菌 株 と 型 別 法

供試菌株： Darrell-Wahba 法 (W法) ピオシン型別用指示菌 12 株 (W 1—W12) および Gillies-Govan 法 (G法) 指示菌 8 株 (G 1—G 8) とその型標準株 2 株 (Ty. 1, Ty. 16) の計 22 株を使用した。いずれも約 1 カ月間隔で普通寒天斜面に継代保存されてきたものを出発材料とした。

Gillies-Govan のピオシン型別法： 1 報記載の方法

と同様に行なった。添加血液としてはウマ脱センイ血液 (椎橋) のみを使用し、特記しない場合はすべてトリプトソイ寒天培地 (栄研) を基礎培地とした。

Darrell-Wahba のピオシン型別法： 使用シャーレを G 法と統一し、その内径 84mm のものに約 40ml を注加して用いたほかは 3 報と同様に行なった。

実 験 と 説 明

第 1 実験： 基礎培地として Tryptone soya agar (Oxoid) とトリプトソイ寒天培地 (栄研) の比較、さらに G 法では添加ウマ血液の保存期間、W 法では培地への 3 添加物に及ぼす加熱の影響を知るとともに、ピオシン型別結果の再現性も検討する目的で以下のように行なった。昭和 45 年 1 月下旬供試 22 株はすべて一旦普通寒天平板に分離し、塩野谷、本間 (1968) の la 型集落単個を普通寒天斜面に培養、翌日初回の産生菌としてブイヨン培養を行なった後はゴム栓を施して室温に保存、以後は必要に応じてこれより直接ブイヨン培養して産生菌または指示菌として用いた。実験は 3 回にわかれ、2 回目は 2 日後、3 回目はさらに 5 日後に行なった。G 法の場合 1、2 回目は Oxoid 培地を基礎として、これに購入直後と 3 週間氷室保存のウマ血液を加えたものの比較、3 回目は添加血液としては新鮮なものを用いた際の両基礎培地の比較を行なった。W 法では 1、2 回目は基礎培地間の比較、3 回目は栄研製のみを用い、ザイツ濾過により滅菌した 100 倍濃度の 3 添加物混合液を加えた場合と常法 (添加後高压滅菌) を比較した。

G 法の成績をみると、表 1 に示した 8 株では 6 成績が完全に合致し、表の順に 28 型、非産生、3 型 2 株、1 型 4 株と判定されたが、残る 14 株では表 2 に示す結果が得られた。原法そのままの培地として Oxoid 製と新鮮血の組合せ (1, 3, 5 段) による成績を比較すると、W 2 (3 型)、W 5 (1 型)、W 6 (3 型) を

除く 11 株では不一致がみられたが、3 回のうち 2 回の成績合致で型別すると、G 3 (35 型)、G 4 (3 型)、G 7 (5 型)、Ty. 16 (16 型)、W 4 (10 型)、W 7 (1 型)、W 8 (1 型)、W 9 (10 型)、W 10 (3 型) の 9 株がこれに該当し、G 2、W 11 の 2 株が variable type (VT) となる。Oxoid 培地と保存血の組合せとして 2, 4 段目をみると、G 2 (31 型)、G 4 (3 型)、Ty. 16 (型別不能)、W 4 (10 型)、W 5 (1 型)、W 6 (3 型)、W 7 (1 型)、W 8 (1 型)、W 10 (3 型)、W 11 (3 型) と、G 3、G 7、W 2、W 9 の 4 株を除いては型別可能である。この結果を上記新鮮血の場合と比較すると W 5、W 6 では 5 成績、G 4、W 4、W 7、W 8、W 10 は 4 成績が合致すなわち両判定結果が

Table 1. Results of reproducible strains observed by Gillies-Govan method of the first experiment

Strains	Patterns
G 1	- - - + - - + -
G 5	- - - - - - - -
G 6	+ + + - + - + -
G 8	+ + + - + - + -
Ty. 1	+ + + + + - + +
W 1	+ + + + + - + +
W 3	+ + + + + - + +
W 12	+ + + + + - + +

符合しており、残る7株のうち6株ではW 2が4成績、G 3、G 7、Ty.16、W 9、W11では3成績が合致し、Ty. 16、W11 以外では保存血による成績のうち符合しないのは指示菌のうち1株（順にG 7、G 5、G 3、G 8）に対してのみであって、今回検討した約3週間の血液保存は成績判定に影響しなかったといえる。栄研製培地に新鮮血を加えて得られた6段目の成績のうち、G 4、W 4、W 7、W 9、W10、W11の6株は既

述の所見にさらに1回の合致成績を加えるもので、表1の8株を加えると、供試22株のうち14株では基礎培地による差はみられなかったこととなる。この所見はさらに、G 2では保存血による2成績と、Ty.16では新鮮血のうち2回でみられたものと、G 3、G 7では1、2回目のパターンとは異なるものの同時に実施したものと合致したことによっても支持される。本培地の使用はG法に関しては1回のみであり、上記でふ

Table 2. Results of non-reproducible strains observed by Gillies-Govan method of the first experiment

Str.	Patterns	Str.	Patterns	Str.	Patterns
G 2	---+-+---	W 2	+++-+--+	W 8	---++--+
	-----+		++++--+		++++--+
	+--+-----		++++--+		+--+--+
	-----+		+++-+---		++--+--+
	---+-----		+++-+--+		++--+--+
	-----+		+++-+---		-+-----
G 3	++-+--+	W 4	++++++	W 9	---++++
	++-+--+		++++++		+--+++++
	++-+--+		++++++		++++++
	++-+--+		++++++		++++++
	-+--+---		-+--+++		++++++
	-+--+---		++++++		++-++++
G 4	+++--+--+	W 5	++++--+	W10	+++--+--+
	+++--+--+		++++--+		+++--+--+
	+++--+--+		++++--+		++--+--+
	+++--+--+		++++--+		++--+--+
	++--+--+		++++--+		++--+--+
	++--+--+		++--+--+		++--+--+
G 7	-----	W 6	+++--+--+	W11	-+--+--+
	---+-----		++--+--+		+++--+--+
	-----		+++--+--+		+++--+--+
	-----		+++--+--+		+++--+--+
	---++--+		++--+--+		+++--+--+
	---++--+		-+--+--+		+++--+--+
Ty. 16	+--+--+	W 7	++++--+		
	+--+--+		++++--+		
	+--+--+		++++--+		
	+--+--+		++++--+		
	+--+--+		++++--+		
	+--+--+		++++--+		

First, 3rd and 5th, 2nd and 4th, and 6th patterns from the top of each strain were obtained by Oxoid TSA with fresh blood, Oxoid TSA with 3 weeks old blood, and Eiken TSA with fresh blood respectively.

れなかったW 2, W 5, W 6, W 8特に後の2株ではかなりな変動がみられるので結論は下し得ない。しかしわが国における実用面を考慮して以後の実験には原法に使用の基礎培地に代えて本培地を用いることとした。第2実験以下で得られた成績を綜合したものとOxoid 培地での結果の比較は後に考察を加える。

一方W法により得られた成績では、表3の5株では6成績が合致したが、いずれも原表(古川, 1970参照)に示されたパターンとは異なっていた。表4には不一致点が見られた残る17株の成績を示した。原法に使用のOxoid 培地による成績として1, 3段目を比較すると、G 5, G 6, G 7, G 8, Ty. 1, W 7の6株では合致がみられ、G 3, W 1, W 3, W 5, W 11, W 12の6株はそれぞれ指示菌のうち1株(順にW 1, W 6, W 4, W 2, W 9, W 2)に対する態度の差のみであった。栄研製を用いた2, 4, 6段目をみると、G 5, W 7で3成績すべて、G 2, G 3, G 6, Ty. 1, W 3, W 5, W 11, W 12の8株で2成績が符合していた。これら2群を総合すると、G 5, W 7で5成績、G 6で4成績、G 2, G 3, G 7, G 8, Ty. 1, W 3, W 5, W 11, W 12の9株で3成績が合致し、基礎培地による差はないものとしてもよい所見である。濾過滅菌添加物を加えた5段目の成績は、上記5成績の符合したG 5, W 7では1カ所での不一致がみられたが、G 3, G 6, G 8, W 11, W 12の5株では上述の所見にさらに1回の合致成績を加えたこととなった。このほかG 7, W 5では3回目のパターンは同じであり、G 2, W 3でもその間に1指示菌に対する態度に差がみられただけで、全体としてみると添加物に対する加熱の影響は否定し得るものと思われた。

両法による成績を培地の差は考慮にいれず再現性として通覧すると、6, 5, 4成績の合致した株数がG法で8, 6, 4株に対して、W法では5, 3, 4株であってW法の劣性が認められる。しかしこれが指示菌株の数によるものともいえるので、3報でW法の判定に適用を行なったZabransky and DayのMayo方式に準じて、指示菌W 1—W 8についての成績として整理すると、上記の順に6, 4, 5株となったものの、やはりその劣性は否定できない。

第2実験: Gillies and Govan (1966)は180株を用いて、両法培地および培養条件を組合せた比較を行っている。われわれも1報で培養温度と時間による成績変動を確認したが、使用培地の差による変動の有無を自験するために本実験を行なった。供試菌株は、G法指示菌および型標準株から、G 2はVT, G 5は

Table 3. Results of reproducible strains observed by Darrell-Wahba method of the first experiment

Strains	Patterns											
G 1	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—
W 2	+	—	+	—	+	—	+	—	+	+	—	—
W 6	+	—	+	—	+	—	+	—	+	+	—	—
W 8	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	+
W 9	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+

NT, G 6, G 8はG 4と同型であるので除外した6株とし、トリプトソイ寒天培地(栄研)を基礎培地に、G法培地、W法培地(常法調製と濾過滅菌した3添加物加)と参考までに基礎培地の4種で比較を行なった。この実験は第1実験第3回目の2日後に実施したもので、前実験に供試した斜面培養を用い、G法、W法はそれぞれの培養温度と時間で併行して行なった。

G法による成績は表5のようであり、G 4, G 7, Ty. 1では4培地ともに同一パターンを示し、Ty. 1では前実験を含めて完全に、G 4では前回の1成績を除く9成績が、G 7では前回の弱い阻止以外では完全に合致したが、残る3株ではG 3とTy. 16でそれぞれ2種のパターンがみられるものの培地間に一定の関係は認められず、前実験で6成績すべてが28型であったG 1は全く異なったパターンを示した。

W法では表6に示した成績が得られ、完全に合致したのはG 1のみであったが、G 3, G 7, Ty. 1ではそれぞれ1カ所のみ、G 4でも2カ所の差であって、W法に用いられている3添加物の意義は認められない所見であった。今回の成績を表3, 4と比較すると、G 1は10成績すべて、G 3が4回と3回、G 7とTy. 1では2回と3回のパターンが合致していた。

本実験では供試菌株が6株と少ないので結論は下し得ないが、G法、W法ともに基礎培地のみでも目的を達し得るとの所見であったといえる。

第3実験: 緑膿菌の解離集落型1a, smによるピオシン感受性の差は塩野谷, 本間(1968)によって報告されているが、それらによる産生ピオシンの作用域に関する検討はなされていない。そこで今回供試の22株より1a型, sm型集落の分離を試み、その獲得後同一日に両型別法を併試し、しかも産生側、感受性側からの検討も加えることとした。産生株、指示菌セットそれぞれについて1a型菌, sm型菌、さらに常法により継代保存のものも加えて比較することとしたので、実施に当たっての制約から産生菌側には供試22株のうち

Table 4. Results of non-reproducible strains observed by Darrell-Wahba method of the first experiment

Str.	Patterns	Str.	Patterns	Str.	Patterns
G 2	±-++-+-----+-	G 8	+--++++-++--	W 5	++---+---++-+
	-----+-----+-		+--++++-++--		++---+---++-+
	--+---+-----		+--++++-++--		+-----+---++-
	--+---+-----		+--++++-±-+-		++---±----++-
	--±-+-----±-		+--++++-++--		+-----+---++-
G 3	--+---+-----	Ty. 1	+--++++-++--	W 7	+-----+---±-
	+--+-----+--		+++--+--+--+		++---+---++-±
	---±-----+--		+++--+--+--+		++---+---±++-
	---+-----+--		+++--+--+--+		±±---±----++-
	---+-----+--		+--++++-++--		±+---+---+--+
G 4	---±-----±-	Ty. 16	+±+--+±-±-	W10	±±---±----++-
	+--+--+--+--+		±+--+-----+--		+-----+-----
	±-±-+±+--+--		-+±+±-±-+++		+-----+-----
	±-±-+--+±±±-		-+--+---±+++-		±---±------
	±±-+--+±-±±±-		-±-±-+-----		-----+-----
G 5	-----+±±±-	W 1	-+--+--+--+	W11	+--+--+--+--+
	-+-----+-----		-+--+±+-----		+--+±+--+--+
	-+-----±-----		-+--+++-----		±-+--+±+--+
	-+-----+-----		-+--+±-±-----		+--+--+±+--+
	-+-----+-----		-+--+-----		+--+--+--+--+
G 6	+--+--+--+--+	W 3	+++--+--+--+	W12	+++--+--+--+
	+--+--+--+--+		+++--+±--+--+		+++--+--+--+
	+--+--+±+--+		±±-+--+±--+		+--+--+--+--+
	-+--+±+--+		+++--+--+--+		+++--+±-±+--
	+--+--+±+--+		+++--+--+--+		+++--+--+±+--
G 7	+--+--+--+--+	W 4	+++--+--+--+		+±+--+--+--+
	+--+±-----+±-		+++--+--+--+		
	+--+±-----+±-		++±-+±±+±-		
	+--+±-----+±-		+++--+--+--+		
	+±-±-----+±-		+++--+--+--+		

First and 3rd patterns from the top of each strain were obtained by Oxoid TSA and others were obtained by Eiken TSA.

Fifth one was supplemented by the mixed solution of three supplements sterilized by Seitz filtration.

Table 5. Results obtained by Gillies-Govan method of the second experiment

Str.	Patterns	Str.	Patterns	Str.	Patterns
G 1	- ± ± ± - - + -	G 4	+ + + - + - + -	Ty .1	+ + + + + - + +
	- ± - ± - - ± -		+ + + - + - + -		+ + + + + - + +
	- ± - ± - - - -		± + + - + - + -		+ + + + + - + +
	- + - ± - - - -		+ + + - + - + -		+ + + + + - + +
G 3	+ + - - + - - -	G 7	- - - - + - - -	Ty.16	+ - + + - - + +
	- + - - + - - -		- - - - + - - -		± - + - - - + +
	+ + - - + - - -		- - - - + - - -		+ - + - - - + +
	- + - - + - - -		- - - - + - - -		± - + ± - - + +

From the top of each strains, patterns were obtained by 5% horse blood TSA, plane TSA, TSA with filtrated and heated supplements of Darrell-Wahba.

Table 6. Results obtained by Darrell-Wahba method of the second experiment

Str.	Patterns	Str.	Patterns	Str.	Patterns
G 1	- + - - - + - - - + - -	G 4	± - ± - + + + - + ± - -	Ty. 1	+ + + - + + + - - ± - -
	- + - - - ± - - - + - -		+ - + ± + + ± - ± + - -		+ + + - + + + - - + - -
	- + - - - ± - - - + - -		± - ± - + + ± - ± ± - -		+ + + - + + + - - + - -
	- + - - - + - - - + - -		+ - + - + - + - ± ± - -		+ + + - + + + - - ± - +
G 3	- - - ± - - - - + - -	G 7	+ + - + - - - - + + -	Ty.16	± + ± + - - - - ± ± - -
	- - - + - - - - + ± -		+ + - + - - - - + + -		+ + ± + ± - - ± + + + +
	- - - + - - - - + - -		+ + - + - - - - + + -		- ± - + ± - - - ± + - -
	- - - + - - - - ± - -		+ - + - - - - - + + -		+ + - + - ± - ± + + + -

Remarks are the same as for Table 5.

Table 7. Results of strains showing no differences among colonial types of producers by Gillies-Govan method of the third experiment

Prod.	Ind.	Patterns	Prod.	Ind.	Patterns	Prod.	Ind.	Patterns
G 1	la	- - - + - - - -	Ty. 1	la	+ + + + + - + +	W 9	la	+ + + + + + + +
	mix	- - - - - ± -		mix	+ + + + + - + +		mix	+ + + + + + + +
				sm	+ + + + + - + +		sm	+ + + + + + + +
G 4	la	+ + + - + - + -	Ty.16	mix	+ - + - - - + +	W10	la	+ + + - + - + -
	mix	+ + + - + - + -		sm	+ - + + - - + -		sm	+ + + - + - + -
	sm	+ + + - + - + -						
G 7	mix	- - - - + - - -	W 1	la	+ + + + + - + +	W12	la	+ + + + + - + +
	sm	- - - - + - - -		mix	+ + + + + - + +		mix	+ + + + + - + +
				sm	+ + + + + - + +			

"la or sm" indicates the culture originated from a la or sm colony. "mix" indicates ordinarily subcultured ones. (They are used in Tables 8-14.)

11株を使用した。この場合その選定には第1実験G法の結果を参考に、同一型は1株(W法で差がみられる場合は2株)を用いることを原則とした。昭和45年2月下旬、予め純化しておいた22株よりの1a型およびsm型の斜面培養のうち上記11株分を平板に分離、翌日定型的な集落各1個と常法により継代保存中の斜面からブイヨンに移植、3日目には産生株33種の塗抹を行なうとともに、上記11株については同一集落の残部より、残る11株ではそれぞれの両集落型の保存斜面より平板に分離、4日目には定型的集落各1個と常法保存斜面菌をブイヨンへ植菌、培養4時間後に指示菌として塗抹した。その成績を、G法、W法に区分し、さらに産生面、感受性面それぞれでの集落型に整理して以下に表示するとともに説明を加える。

G法での成績をピオシン産生株における集落条件の差として整理すると、まず産生株の3条件に関係なくある指示菌セットに対して単一なパターンを示したのは、産生側11株33種のうち表7に示す22種であった。残る11種では表8のようになり、G7、W12では1a型、sm型による産生ピオシンの作用域はそれぞれにつき同一であり、また表7のパターンとも合致していた。そこで全成績を1a型、sm型菌の産生ピオシン間の異同としてみると、33種のうち24種には差がなかったこととなる。表8で残る9種のうちG1、G2の3種、Ty.16、W10ではsm型菌産生ピオシンの作用域は1a型菌のそれに1—2指示菌を加えたものとなって

おり、G3では3種とも異なった作用域を示していた。表8で各株に対する成績のうち中段に示した常法保存斜面菌(両集落型の混在と考えられる)による産生ピオシンは、G1、Ty.16では1a型菌のそれと、G3の2種、W10ではsm型菌と同じパターンを示し、残る6種ではいずれも異なった態度をとっていた。

W法によって得られた成績を同じく産生株側から整理すると、33種のうち17種では産生株の性状に関係なく表9に示したパターンがみられた。表10に示したのが残る16種についての成績であり、G4×1a、W10×mixの2種では1a型、sm型産生ピオシンは同一パターンを示し、1a型、sm型菌間の産生ピオシンが合致したのは33種のうち19種となる。表10のもののうちG2の2種、G4×mix、G7の2種、Ty.16×sm、W1、W10×1aではsm型菌産生ピオシンの指示菌1—2株に対する作用域拡大、G3の2種、W12では逆に種々の縮小がみられ、残る3種(G2×sm、Ty.16×1a、W10×sm)では異なったパターンがみられた。各株中段の成績では、G3×1a、G4×mix、W1、W12では1a型菌と同じであったが、残る12種では、sm型菌と一致したものはなく、すべて複雑な関係であった。ついでW法による成績のうちW1—W8に対する部分のみで整理してみたが、1a型、sm型菌によるパターンの合致にW12、sm型菌ピオシンでの作用域拡大にW10×smが加えられたのみであった。

以上とは逆に、G法の成績を、あるピオシンに対す

Table 8. Results of strains showing differences among colonial types of producers by Gillies-Govan method of the third experiment

Prod. Ind.	Patterns	Prod. Ind.	Patterns	Prod. Ind.	Patterns
G 1 sm	— — — + — — ± — — — — + — — ± — — ± — + — — ± —	G 3 1a	— — ± — — — + — — + — — + — + — — + — — + — + —	Ty.16 1a	± ± + + — — + + ± + + + — — + ± + ± + + ± — + ±
G 2 1a	— — ± ± — + ± — ± + + + + ± + — ± — + ± — + + ±	G 3 mix	— — ± + — — + — + + — — + — — — ± + — — + — — —	W10 mix	± ± ± — ± — + — + + + — + — + ± + ± + — + — + +
G 2 mix	— — ± — — — ± — ± — + ± — — ± — ± — + — — — + +	G 3 sm	— — — — — — ± — — + — — + — — — + + — — + — — —	W12 sm	+ ± + ± + — + ± ± ± + ± + — — — + + + + + — + +
G 2 sm	— — ± — — — — — — — ± + ± — — — — — + — — — + —	G 7 1a	— — — — + — — — — — + — + — — — — — — — + — — —		

Patterns from the top of each strain were obtained by 1a, mix and sm cultures of producers respectively.

Table 9. Results of strains showing no differences among colonial types of producers by Darrell-Wahba method of the third experiment

Prod.	Ind.	Patterns	Prod.	Ind.	Patterns
G 1	la	-+-+--+--+--	Ty.16	mix	-+-+-----
	mix	-+-+--+--+--			
	sm	-+-+--+--+--			
G 3	mix	---+-----	W 1	la	-+-+---+---
G 4	sm	+--+--+--+--+		sm	-+-+---+---
G 7	sm	+--+--+--+--+	W 9	la	+++--+--+--+
				mix	+++--+--+--+
				sm	+++--+--+--+
Ty. 1	la	+++--+--+--+	W12	la	+++--+--+--+
	mix	+++--+--+--+		sm	+++--+--+--+
	sm	+++--+--+--+			

Table 10. Results of strains showing differences among colonial types of producers by Darrell-Wahba method of the third experiment

Prod.	Ind.	Patterns	Prod.	Ind.	Patterns
G 2	la	--+--+--+--+	G 7	mix	+--+--+--+--+
		+--+--+--+--+			+--+--+--+--+
		+--+--+--+--+			+--+--+--+--+
G 2	mix	--+--+--+--+	Ty.16	la	+--+--+--+--+
		+--+--+--+--+			+--+--+--+--+
		+--+--+--+--+			+--+--+--+--+
G 2	sm	--+--+--+--+	Ty.16	sm	--+--+--+--+
		+++--+--+--+			+++--+--+--+
		+++--+--+--+			+++--+--+--+
G 3	la	+--+--+--+--+	W 1	mix	+--+--+--+--+
		+--+--+--+--+			+--+--+--+--+
		+--+--+--+--+			+--+--+--+--+
G 3	sm	+--+--+--+--+	W10	la	+--+--+--+--+
		+--+--+--+--+			+--+--+--+--+
		+--+--+--+--+			+--+--+--+--+
G 4	la	+--+--+--+--+	W10	mix	+--+--+--+--+
		+--+--+--+--+			+--+--+--+--+
		+--+--+--+--+			+--+--+--+--+
G 4	mix	+--+--+--+--+	W10	sm	+--+--+--+--+
		+--+--+--+--+			+--+--+--+--+
		+--+--+--+--+			+--+--+--+--+
G 7	la	+--+--+--+--+	W12	mix	+++--+--+--+
		+--+--+--+--+			+++--+--+--+
		+--+--+--+--+			+++--+--+--+

Remarks are the same as for Table 8.

Table 11. Cases showing no differences among colonial types of indicator sets by Gillies-Govan method of the third experiment

Producers	Patterns	Producers	Patterns	Producers	Patterns
la	+++--+-+--	la	+++++--++	la	+++++++
G 4 mix	+++--+-+--	Ty. 1 mix	+++++--++	W 9 mix	+++++++
sm	±++--+-+--	sm	+++++--++	sm	+++++++
la	-----+----	la	+++++--++	W10 la	+++--+-+--
G 7 sm	-----+----	W 1 mix	+++++--++	W12 la	+++++--++
		sm	+++++--++	sm	+++++--++

Table 12. Cases showing differences among colonial types of indicator sets by Gillies-Govan method of the third experiment

Producers	Patterns	Producers	Patterns	Producers	Patterns
G 1 la	---+----- -----±- ---+---±-	G 3 la	--±-----+ --±+---+-- -----±-	Ty.16 mix	±++++-+± +-+-----+ ±-+---+-
G 1 mix	---+----- -----±- ---+---±-	G 3 mix	-+---+--+ ++---+--- -+---+---	Ty.16 sm	+±++±-+± +-+-----+ +-+---+-
G 1 sm	---+----- -----±- -±+---±-	G 3 sm	-+---+--+ ±+---+--- ++---+---	W10 mix	+++++--+ +++++--+± ±±+--+--
G 2 la	--±±-+±- --±-----±- --±-----	G 7 mix	--+--+--- -----+--- -----±---	W10 sm	+++++--+ +±+--+--+ +++++--+
G 2 mix	±++++±+- ±-+±+-±- --±+±---	Ty.16 la	±±++--+ +-+---+ +-+--+--	W12 mix	+++++--+ +++++--+ ±±+±+---
G 2 sm	±-+±-++± ±-+---+ --+---+-				

Patterns from the top of each strain were obtained by la, mix and sm cultures of indicator sets respectively.

Table 13. Cases showing no differences among colonial types of indicator sets by Darrell-Wahba method of the third experiment

Producers	Patterns	Producers	Patterns
la	-+-----+-----	la	+++--+--+--+--
G 1 mix	-+-----+-----	Ty. 1 mix	+++--+--+--+--
sm	-+-----+-----	sm	+++--+--+--+--
		W 1 sm	-+---+---+---
G 4 sm	+--+--+--+--+--	W12 la	+++--+--+--+--
		mix	+++--+--+--+--

る集落性状別指示菌セット3種の示す態度として整理したところ、産生株33種のうち表11に示した17種では指示菌セットによる差はみられなかった。表12に示し

た16種では種々の程度に差異がみられたが、W10では2種とも la型、sm 型指示菌による差はなく、G 1の3種ではいずれも sm型指示菌セットでの感受性域拡

Table 14. Cases showing differences among colonial types of indicator sets by Darrell-Wahba method of the third experiment

Producers	Patterns	Producers	Patterns
G 2 la	--±--+-+---+-- --+-+---+---±- ---+±+-+---±+±	Ty.16 mix	-+-±-+-+---+-- -±-+-+---+--- ±-+-+-+---+---
G 2 mix	+--+--+---+---+ +--+--+---+---+ +++++--+---±±±	Ty.16 sm	-++++-+-+---+-- -+-+---+---+--- --±+-+±-+---+--
G 2 sm	±-+++-+---+--- +--+--+---±-+--- ±±+++-+---+---	W 1 la	-+-+---+---+--- -+-+---+---+--- -+-+---+---+---
G 3 la	±-+-+---+---+--- ---+---+---±-+--- ±-+-+---+---+---	W 1 mix	-+-+---+---+--- -+-+---+---+--- -+-+---+---+---
G 3 mix	±-+-+---+---+--- ---+---+---±-+--- ±-+-+---+---+---	W 9 la	+++++---+---+--- +++++---+---+--- +++++---+---+---
G 3 sm	-----+---+--- ---+---+---+--- ---+---+---±-+---	W 9 mix	+++++---+---+--- +++++---+---+--- +++++---+---+---
G 4 la	+--+--+---+---+--- +--+--+---+---+--- +--+--+---+---+---	W 9 sm	+++++---+---+--- ±±+-+---+---+--- ±+-+---+---+---
G 4 mix	+--+--+---+---+--- +--+--+---+---+--- +--+--+---+---+---	W10 la	-----+±----- ±-----±±±----- ±-----+-+---±-±
G 7 la	+--+--+---+---+--- +--+±-----+--- +--+--+---+---±±±	W10 mix	+-----±+-+---+--- ±-----+-+---+--- ±-----+-+---+---
G 7 mix	+±-±-----+--- +-----+---+---±- +--+--+---+---±±±	W10 sm	+-----+-+---+--- +-----+---+---+--- ±-+-+---+---+---
G 7 sm	+±-±-----+--- +±-±-----+--- +--+--+---+---±±±	W12 sm	+++++---+---+--- +++++---+---+--- +++++---+---+---
Ty.16 la	±±-+-+---+---+--- -±-±-----+--- ---+-+±-----+---		

Remarks are the same as for Table 12.

大, G 2 の 3 種, G 3 の 1a と mix, G 7, Ty. 16 の 3 種, W12 では逆に縮少がみられ, G 3 sm では異なったパターンであった. 本表中段の成績では W12 は 1a 型指示菌と, G 3 sm, G 7 では sm 型指示菌と合致したが, G 2 の 3 種では両型の中間的なパターンを示し, 残る 10 種ではいずれとも異なった態度であった.

一方 W 法の場合は, 表 13 の 10 種が指示菌セットによる差異を示さず, 残る 23 種では表 14 のようであった. 同表のうち, 1a, sm 型指示菌での成績が一致したのは G 4 1a, W 1 の 2 種, W12 であり, G 2 の mix と sm, G 3 のすべて, G 4 mix, G 7 1a, W10 sm では sm 型指示菌側での感受性株の増加, W 9 のすべてと W10 mix でのその減少がみられ, 残る 7 種では両型セット間の差異は複雑であった. 通常保存の指示菌セットでは, G 2 1a, G 7 の 1a と sm, 3 種の W 9 で 1a 型セットと, G 3 sm は sm 型セットと同じパターンを示し, 残る 16 種には, 中間的なパターンはみられずいずれも複雑な態度であった. ここでも指示菌 W 1—W 8 の範囲内での成績整理を行なったところ, W12 sm が 3 セット合致, 解離両型指示菌間に差がなかったものとして G 7 1a, sm 型セット側での感受性株数の減少例として G 7 の mix と sm が加えられた.

本実験で同一株の 1a 型菌と sm 型菌がその産生ピオシンに差を示したのは, 供試 33 種のうち G 法で 9 種, W 法 14 種であるのに対して, 指示菌セットの集落型によって同一ピオシンへの感受性に差を認めたのは, G 法 13 種, W 法 19 種となり, 産生側よりも型別に対する影響が大であり, 指示菌側でも集落型を考慮すべきであることを示している. そこで, 菌株の平板分離を行なうと 1a 型菌集落が多く sm 型菌集落の検出が困難な株も存在すること, また本間らによる血清型別(1970)に 1a 型菌を, さらにわれわれも 2 報以来それを使用していることなどを考慮して, 今後は産生株, 指示菌株ともに使用前日一旦平板に分離, 1a 型菌単個集落をブイオンに培養して用いることにした.

第 4 実験: ここでは産生菌として両型別法指示菌の 1a 型単個集落と G 法型標準株の 1a 型集落 9 個ずつを用い, 指示菌には 2 個の 1a 型集落からそれぞれ培養した 2 セットを使用, G 法と W 法を同時に実施して, 集落の差による成績の変動の有無を検討しようとした.

G 法による全成績を示したのが表 15 であり, 供試 38 集落のうち G 1, G 2, W 6 と Ty. 16 の集落 4, 7, 計 5 集落で指示菌のセット差による不一致がみられたのみで, 33 集落では相異点はなかった. 産生株の集落

Table 15. Results obtained by Gillies-Govan method of the fourth experiment

Producers		Patterns	Producers		Patterns	Producers		Patterns	
G 1		- ± ± + - - - - - ± ± + - - ± -	G 5		- - - - - - - -	W 1		+ + + + + - + +	
G 2		± - + - - - + - - - ± - - ± ± -	G 6		± + + - + - + -	W 2		+ + + - + - + -	
G 3		+ + - - + - + -	G 7		- - - - + - - -	W 3		+ + + + + - + +	
G 4		+ + + - + - + -	G 8		+ + + - + - + -	W 4		+ + + + + + + +	
						W 5		+ + + + + - + +	
			1		+ - + + - - + -				
1		+ + + + + - + +	2		+ ± + + - - + -	W 6		- + - - + - - - + + + - + - + -	
2		+ + + + + - + +	3		+ - + + - - + -				
3		+ + + + + - + +	4		+ ± + + - - + - + - + + - - + -	W 7		+ + + + + - + +	
4		+ + + + + - + +	Ty.16		5	+ - + + - - + -	W 8		+ + + + + - + +
Ty. 1		5			6	+ - + + - - + -	W 9		+ + + + + + + +
		6			7	+ - + + - - + - + ± + + - - + -	W10		+ + + - + - + -
		7			8	+ - + + - - + -	W11		+ + + - + - + -
		8			9	+ - + + - - + -	W12		+ + + + + - + +
		9							

A pattern for each strain indicates that no difference was observed between two sets of indicator.

In the cases of Ty. 1 and 16, the production of pyocine was compared with nine of 1a colonies.

差については, Ty.1 では全く問題点はなく, Ty. 16 では集落 2, 4, 7 を除く 6 集落の重複成績と集落 4, 7 のそれぞれ 1 成績が同一パターンを, 集落 2 の 2 成績と同 4, 7 の残るものはそれに G 2 への阻止が加わったパターンを示していた.

一方 W 法では表 16 に示した成績が得られ, 指示菌 2 セット間に差がみられなかったのは 11 株 17 集落にすぎなかった. また指示菌 W 1—W 8 に対する成績に限った場合でも W 2, W 8, W 12, Ty. 1 の集落 8 が追加されるのみであった. 産生株の集落間では, Ty. 1 は

集落 7, 8 で一方のセットの 1 指示菌への弱い阻止が加わったのみで, まず問題はなかったのに対して, Ty. 16 の場合は全集落にわたって, またそれぞれの指示菌セットでも多様なパターンがみられた.

結局 G 法に関しては産生菌, 指示菌いずれにおいても集落による成績の変動はなかったといえる. W 法の場合, あまりにも著しい差がみられた Ty. 16 には他の原因があるものとも考えられるのでこれを除外すると, 指示菌 2 セットの比較では 29 種のうち 17 種で合致, 不一致例 12 種のうち G 7 を除く 11 種では極めて弱い阻

Tadle 16. Results obtained by Darrell-Wahba method of the fourth experiment

Producers		Patterns	Producers		Patterns
G 1		- + - - - + - - - + - -	W 1		- + - - - + + + - - - - ± + - - - + + + - - - -
G 2		± - ± ± ± + - - - - ± - ± - + + - + - - - - ± -	W 2		+ - + - + + + - + + - - + - + - + + + - + + - ±
G 3		+ - - + - ± - - - ± - - + - - + - - - - - + - -	W 3		+ + - - + + + - + + - +
G 4		+ - + - + + + - + + - -	W 4		+ + - - + + + + + - +
G 5		- + - - ± + - - - - - - - + - - - + - - - - - -	W 5		+ + - - - + - - + + - + + + - - - + ± - + + - +
G 6		+ - + - + - + + + + - -	W 6		+ - + - + - + - + + - -
G 7		+ + - + - ± - - - ± ± - + - - ± ± - - - - + - -	W 7		+ + - - - + - - ± + - + ± ± ± - - + - - + + - +
G 8		+ - + - + + + - + + - -	W 8		+ + + + + + + - - + - + + + + + + + + - ± + - +
			W 9		+ + + - + + + + - + + +
			W10		+ - - - + + + - - - - -
			W11		+ - + - + - + + + + - -
			W12		+ + + - + + + - + + - ± + + + - + + + - + + - -
Ty.16	1	+ ± - + - + ± ± - + - - - ± - + + + - - - + - -	Ty. 1	1	+ + + - + + + - - + - +
	2	- + - + ± + + - ± + ± ± - ± - + ± + - ± - + - ±		2	+ + + - + + + - - + - +
	3	- + - + - + ± - - + ± ± - ± - + - + - ± - + - -		3	+ + + - + + + - - + - +
	4	- + - + - + ± - ± + - - ± + - + - + ± - - + - -		4	+ + + - + + + - - + - +
	5	± + - + - + ± - - + - - - + - + - + - - - + - -		5	+ + + - + + + - - + - +
	6	± + - + - + ± - ± + - - - + - + ± + ± ± - + - ±		6	+ + + - + + + - - + - +
	7	- + ± + - + ± - - + - - + + - ± - + - - - + - ±		7	+ + + ± + + + - - + - + + + + - + + + - - + - +
	8	- + - + - + + - ± + ± - - ± - ± - + - - - + - ±		8	+ + + - + + + - - + - + + + + - + + + - ± + - +
	9	- ± - + - + ± - - + - - - ± - + ± + - - - + - ±		9	+ + + - + + + - - + - +

Remarks are the same as for Table 15.

止が一方へ追加されたに過ぎず、産生株の集落差も Ty.1 の9集落のみで判断すると、いずれの面でも一

応問題はないものとみられる。

考

最初に、本報で示した成績のうちで各株ごとに成績再現性の対象とし得るもの、すなわち第1実験（以下Ⅰ）で6回中3回以上みられたパターン、第2実験（Ⅱ）の該当培地による成績、第3実験（Ⅲ）で相互に1a型菌使用の場合と第4実験（Ⅳ）の間で比較を行なって、以下の考察に利用することとする。この場合Ⅱに使用された6株は4回、Ⅱを除いては3回供試した5株、Ⅰ、Ⅳで比較し得る11株となるので、以下それぞれ6、5、11株群と称する。

G法では6株群のうち4回を通じて同一判定が得られたのはG4:3型、G7:5型、Ty.1:1型の3株で残るG1、G3、Ty.16では成績が一定せず、5株群ではG2が不定であったほかはW1:1型、W9:10型、W10:3型、W12:1型と3回合致し、11株群のうちW3（3型と1型）を除く10株は、G5:NT、G6、G8、W2、W6（Ⅳの1成績）、W11ともに3型、W4:10型、W5、W7、W8:1型となり、供試22株のうち5株を除いては再現性がみられたこととなる。一方W法では6株群でG1とTy.1が4回、G3とG7がⅠとⅡで、G4がⅢとⅣで一致し、Ty.16が不定であり、5株群はW9とW12で3回、W1はⅢとⅣの1成績が合致、残るG2、W10は不定となり、11株群では不定なW2、W3、W4を除く、G6、G8、W6、W11では完全に、G5、W5、W7、W8はⅣの1成績が一致し、22株のうち全く再現性がないものは6株でG法と近似となる。しかしその内容を詳細にみると一部合致例がより多く含まれG法に劣ることは明らかであった。このW法の評価は指示菌W1—W8に限定しG法と対等としても、6株群のG7が3回、5株群でG2がⅠとⅡで、11株群のW3が合致とやや増加したのみで、その劣性傾向は否定できなかった。これらの所見を各株の安定性としてみると、G1がW法、W2、W4、W10はG法で安定であるが他法で不定であって、再現性の問題は産生株側からのみでは解決し得ず、指示菌側および培地の差も考慮する必要があると考えられる。

第1実験G法の結果からは既に説明したように、購入後3週間の血液保存が可能であることは今後の実験に便宜を提供するものである。しかし栄研製基礎培地の使用は当時1回試みられたのみであり、その際表2

察

のG3、G7のように3回目のみ1、2回と異なったパターンがみられたもの、またW5、W6、W8のようにその部分でのみ差異を認めた例もあって、特に前者ではその変化が斜面培養保存1週で行なわれたことによる可能性も考慮する要があり結論を保留した。そこで前述の再現性検討結果を組合せて前後4—2回栄研製培地で得られた成績としてみると、6株群のG4、Ty.1では4成績、G7ではⅠを除く3成績、5株群のW1、W9、W10、W12で3成績、11株群はG5、G6、G8、W4、W7、W11で2成績が合致したこととなり、Ⅰで差のあったG7では充分に、同じくW2、W5、W6、W8ではⅣにおいてOxoid培地との一致成績を追加した訳で、栄研培地を代用し得る所見となった。W法では既に説明したようにOxoid製で3回、栄研製2回の実施によって代用可との結論を得ている。W法に関して非加熱添加物で試みたのは、その後Ⅱにおいて6株のみで、その際はG1、G3、G7では合致所見があるものの、それ以上の検討は実施しなかったこともあって、本報では特に考察の対象とはせず今後の型別には添加後高圧滅菌したものを使用することとした。

第2実験では少数株の供試ではあったが、培地の差による著変はみられない場合が多く、使用培地の簡略化に希望をもたせられた所見といえるが、この点に関しては別途検討することとする。

第3実験は複雑な組合わせで行なわれ、しかも1回の実施ではあるが、産生菌の個々、指示菌の各セットは全く同一ブイヨン培養を用いているので、全成績を表7—14のように整理して説明を行なった。その結果を要約すると、緑膿菌の解離集落型間には産生ピオシンまたはピオシン感受性の面で差異が認められる場合があり、その影響は感受性の面に大きく、いずれもG法の場合よりもW法において頻度が高かったといえる。そこで既に説明したように今後の型別には被検菌、指示菌ともに新鮮な集落で1a型と確認したものを使用することとした。なお既報で供試した分離株の両集落型による産生ピオシン間の比較も時期を同じくして実施しているが、その成績については次報でのべる。

第4実験は2株についてそれぞれ1a型9集落の、20株では単個集落の産生ピオシンを、各指示菌から同じ

く la 型集落 2 個をとって組合せた 2 種のセットで型別したもので、実験の範囲内では Ty.16 の W 法を除いてすべて、集落の差による変動は否定できたものである。Ty.16 は他の成績からみても変動性が大であるが、本実験 W 法の成績は特に著しく指示菌の同一セットについても区々のパターンがみられ理解に苦しむものである。この点に関しては実験的裏付けはないが、W 法培地による影響かとの疑問も生ずる。

再現性よりみた両法の比較は古川 (1970) および 3 報によって行なわれており、W 法の判定を W1—W8

と G 法指示菌数に等しくしても G 法が勝れていることは明らかであった。しかし古川の第 4 実験を除いてはいずれも両法時期を異にして実施されており、今回の実験は併試による結果である点からその結論に歩を進めたものといえる。既述のように 3 報までに供試した分離株の両法併試による型別は本実験の間に終了、さらに 1 回の追加もあり、そのほか 4 カ所より依頼された多数株についての成績も判明しており、いずれも G 法の優位を示している。

結

1) 緑膿菌の解離集落型である la 型菌と sm 型菌の間には産生ピオシンの作用域およびピオシン感受性に差異を認める場合があり、その変動は感受性側において頻度が高い。

2) 産生菌、指示菌ともに la 型集落個々による成績変動は否定し得る。

3) ピオシン型別に際しては被検菌、指示菌ともに新鮮集落につき la 型を確認して使用することが望ま

論

しい。

4) 従来も使用してきたトリプトソイ寒天培地 (榮研) はいずれの型別法に対しても原法との間に差異を示さないと判定する。

5) G 法に添加するウマ脱センイ血液は少なくとも 3 週間の氷室保存までは使用し得る。

6) 基礎培地単独使用による型別の可能性を示す所見を得た。

恩師青木義勇名誉教授の御校閲に心から謝意を表します。

文

1) Darrell, J.H. and Wahba, A.H. : Pyocine-typing of hospital strains of *Pseudomonas pyocyanea*. J. Clin. Path., 17 : 236—242, 1964.

2) 古川弘明 : 呼吸器疾患患者、特に結核患者喀痰より分離した緑膿菌のピオシン型別, 長崎医学会誌., 45 (8・9) : 515—528, 1970.

3) Gillies, R.R. and Govan, J.R.W. : Typing of *Pseudomonas pyocyanea* by pyocine production. J. Path. Bact., 91 (2) : 339—345, 1966.

4) 本間 遜, 金 桂守, 伊藤晶子, 山田絃子, 塩野谷 博, 河部 靖 : 緑膿菌の血清型別と院内感染, 日細菌誌., 25 (8) : 379—389, 1970.

5) 村上 譲 : 佐世保地方分離緑膿菌の型別 II. Gillies-Govan 法によるピオシン型別, 長崎医学会誌., 45 (12) : 587—592, 1970.

6) 内藤達郎, 岩永祥子, 斉藤 厚, 那須 勝 : 緑

献

膿菌のピオシン型別に関する研究 I. Gillies-Govan 法における培養条件の検討, 感染症学雑誌, 45 (10) : 427—434, 1971.

7) 内藤達郎, 福原秋子, 岩永祥子 : 緑膿菌のピオシン型別に関する研究 II. Gillies-Govan 法における再現性と交叉試験よりみた型の独立性の検討, 感染症学雑誌, 45 (11) : 481—489, 1971.

8) 内藤達郎, 岩永祥子, 小浦正昭 : 緑膿菌のピオシン型別に関する研究 III. Darrell-Wahba 法適用による諸経験, 熱帯医学, 14 (1) : 1—9, 1972.

9) 塩野谷 博, 本間 遜 : 緑膿菌集落の解離, 日細菌誌., 23 (5) : 332—342, 1968.

10) Zabransky, R.J. and Day, F.E. : Pyocine typing of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol., 17 (2) : 293—296, 1969.